

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

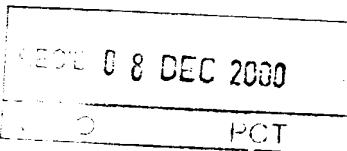
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年10月 8日

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第288532号



出 願 人
Applicant(s):

森下 竜一
住友製薬株式会社

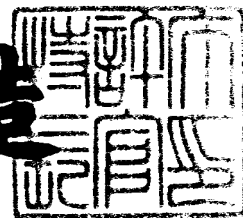
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月20日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3086604

【書類名】 特許願

【整理番号】 132641

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 38/18

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市北春日丘 4 - 1 1 - 3 8 グランドール山口
3 0 2

【氏名】 谷山 義明

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区宮原 2 - 1 1 - 2 2 - 5 0 2

【氏名】 森下 竜一

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府箕面市桜ヶ丘 2 - 7 - 2 9

【氏名】 萩原 俊男

【特許出願人】

【識別番号】 595068287

【氏名又は名称】 森下 竜一

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100107629

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 敏夫

【電話番号】 06-6466-5214

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056546

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9710701

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 心筋症遺伝子治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子のセンダイ・ウイルス（HVJ）リポソーム製剤を心筋内に注入することからなる非侵襲的心筋障害治療剤。

【請求項 2】

エコー使用下に障害心筋部位に非侵襲的に投与することを特徴とする、請求項 1 記載の治療剤。

【請求項 3】

HGF 遺伝子の HVJ リポソーム製剤を少なくとも各週 1 回で 8 回投与することを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の治療剤。

【請求項 4】

HGF 遺伝子として少なくとも $10 \mu g$ を用いることを特徴とする、請求項 1、2 または 3 記載の治療剤。

【請求項 5】

エコー使用下に障害組織部位に非侵襲的に投与することを特徴とする遺伝子治療剤

【請求項 6】

HGF 遺伝子を投与することを特徴とする請求項 5 記載の治療剤

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、センダイ・ウイルス（HVJ）リポソーム製剤で HGF 遺伝子を心筋に注入することからなる非侵襲的心筋障害治療用の遺伝子治療剤に関する。さらに詳しくは、エコー使用下に HGF 遺伝子を的確に患部心筋層に注入し、より効率的に心筋症等の心疾患又は狭心症、心不全を治療するための遺伝子製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年のめざましい医療技術の向上に関わらず循環器領域においては、未だ多くの問題が未解決であり、その中の一つの重要な課題として、心筋障害の問題が挙げられる。

心筋障害とは心筋の器質的および機能的異常に起因する疾患の総称であり、例えば心筋症の場合高血圧、代謝異常症、虚血等の基礎疾患に続発する二次性心筋症と、明らかな基礎疾患なしに発症する突発性心筋症（ICM）に分類される。ICMの内、遺伝子レベルでの病因解明が最も進んでいるのは肥大型心筋症（HCM）である。HCMでは患者の半数以上に常染色体性優性遺伝形式に従う明らかな家族歴が認められる。このような多発家系を対象とした連鎖解析が行われ、これまでに5つの原因遺伝子座が同定され、その内の4座では原因遺伝子自体が特定されている。

また、拡張型心筋症（DCM）の症例の多くは孤発例であるが、約20%には家族歴が認められる。このような多発家系を対象とした連鎖解析から、7つの原因遺伝子座（ただし原因遺伝子は不明）が特定されている。

【0003】

しかしながら、心筋障害に関しては、このように原因遺伝子の特定と発症機構の解明についての研究が行われている状況であり、遺伝子治療に向けた具体的な動きは現在まで行われていない。

一方で、最近の分子生物学の飛躍的向上により、遺伝子導入法による細胞機能の賦活化が可能となり、種々の取り組みがなされてきた。特に、心臓への遺伝子導入法については、静脈内注入法（J.Clin.Invest.,90,626-630(1992)）、直接注入法（Circulation,82,2217-2221(1990)、Circulation,90,2414-2424(1994)）又は、プラスミドをそのまま用いる冠動脈内拡散注入法（J.Thorac.Cardiovasc.Surg.,109,716-720(1995)）等の幾つかの報告があるものの、非侵襲的で具体的な治療につながるものではなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、これまで有効な治療法が見出せていない心筋障害の非侵襲的治療に

好適な遺伝子導入法による遺伝子治療剤を提供することを目的とする。すなわち本発明は、遺伝子としてHGFを使用し、その導入方法として、安全かつ効率の良い遺伝子導入法であるセンダイ・ウイルス（HVJ）リポソーム法（Molecular Medicine,30,1440-1448(1993)、実験医学,12,1822-1826(1994))を用いて心筋症等の心疾患、狭心症、心不全、患部障害心筋のアポトーシスに対してより有効な遺伝子治療剤を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意検討の結果、遺伝子としてHGFを使用し、その導入方法として、安全かつ効率の良い遺伝子導入法であるセンダイ・ウイルス（HVJ）リポソーム法（Molecular Medicine,30,1440-1448(1993)、実験医学,12,1822-1826(1994))を用いて直接患部心筋層に注入することで有効な効果が得られる遺伝子治療剤を見出した。

本発明治療剤は患部心筋内の HGF 遺伝子を直接患部心筋層に注入するため、本発明者等は、エコー使用下で、視覚的に患部心筋層にHGF 遺伝子を注入することが効果的であることを見出した。また、病状に応じて、何回でも当該遺伝子を投与することが可能であり、これによりよりの確な心筋障害の治療ができることを見出した。

このように、本発明者等はエコー使用下で視覚的に直接患部組織に遺伝子を投与し的確な治療が行えることをはじめて見いだしたものであり、各種の臓器特異的な疾患の治療が本発明方法で可能であることを明らかにした。

例えば、HGF 遺伝子を用いた場合本発明の方法により、各種の臓器特異的な疾患例えば、肺線維症あるいは、肝硬変、肝線維症等の治療を行うことができる。

本発明治療剤を注入することで、抗アポトーシス因子の一つである Bcl-xL の減少抑制を示すことから、障害を受けた患部のアポトーシスを防ぎ保護されることでより顕著な効果が得られることを見出した。

【0006】

すなわち本発明の要旨は以下のとおりである。

(1) 肝実質細胞増殖因子 (HGF) 遺伝子のセンダイ・ウィルス (HVJ) リポソーム製剤を心筋内に注入することからなる非侵襲的心筋障害治療剤。

(2) エコー使用下に障害心筋部位に非侵襲的に注入することを特徴とする、上記 (1) 記載の治療剤、

(3) HGF 遺伝子の HVJ リポソーム製剤を少なくとも各週 1 回で 8 回投与することを特徴とする、上記 (1) または (2) 記載の治療剤、

(4) HGF 遺伝子として少なくとも $10 \mu g$ を用いることを特徴とする、上記 (1)、(2) 又は (3) 記載の治療剤、

(5) エコー使用下に障害組織部位に非侵襲的に投与することを特徴とする遺伝子治療剤

(6) HGF 遺伝子を投与することを特徴とする上記 (6) 記載の治療剤

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明の第一の態様は HGF 遺伝子を用いた HVJ リポソーム製剤を心筋内に注入することからなる非侵襲的心筋障害治療剤である。

本発明で使用される HGF 遺伝子とは、HGF を発現し得る遺伝子を言い、当該遺伝子には、発現されるポリペプチドが HGF と実質的に同効である限り、その遺伝子配列の一部が欠失又は他の塩基により置換されていたり、他の塩基配列が一部挿入されていたり、5' 末端及び／又は 3' 末端に塩基が結合したような遺伝子も包含される。かかる遺伝子としては、例えば、Nature, 342, 440 (1989)、特開平 5-111383 号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 967 (1989) などに記載の HGF 遺伝子が例示され、これらの遺伝子を本発明で使用する事が出来る。

【0008】

本発明の HGF 遺伝子は、遺伝子や cDNA あるいは適当なベクターに組み込んだものが使用できる。ベクターとしては、公知の発現ベクターを使用することができる。例えば、組換えアデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターを用いた方法が代表的なものである。より具体的には、例えば、無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワク

シニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、センダイウイルス、SV40、免疫不全症ウイルス（HIV）等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに本発明のDNAを導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって、細胞内に遺伝子を導入することが可能である。

前記ウイルスベクターの内、アデノウイルスの感染効率が他のウイルスベクターを用いた場合よりもはるかに高いことが知られており、この観点からは、アデノウイルスベクター系を用いることが好ましい。

さらには、pBR 322、pBU 110、Tiプラスミド等のプラスミドベクターを挙げることができる。

【0009】

本発明のHVJリポソーム法とは、例えば、Molecular Medicine, 30, 1440-1448 (1993)、実験医学, 12, 1822-1826 (1994)、蛋白質・核酸・酵素, 42, 1806-1813 (1997)等に記載の方法であり、好ましくは、Circulation, 92 (Suppl. II), 479-482 (1995)に記載の方法を用いることが挙げられる。なおHVJとしてはZ株（ATCCより入手可能）が好ましいが、基本的には他のHVJ株（例えば ATCC VR-907や ATCC VR-105など）も用いることができる。

本発明で導入されるHGF遺伝子以外に、内因性の心筋保護因子や心筋細胞における再生因子を併用することが可能である。例えば、心筋細胞障害時に高度に発現されるTGF- β や熱ショック蛋白（HSP）等の因子は心筋障害を軽減し心筋修復に関与することが報告されており、これらの遺伝子を使用することが出来る。又、EGF等の増殖因子は、組織の種々の細胞障害を修復することが報告されており、これらの遺伝子を用いることも可能である。更には、これらの心筋保護因子や再生因子以外にも、心筋保護や再生に関与する因子が考えられる。

【0010】

本発明では、このようにHGF遺伝子を単独に或いは組み合わせて心臓の心筋細胞に導入し、高度に発現させて、損傷を受けた心筋細胞等に必要な目的蛋白を合成させることができる。そしてこれにより、損傷を受けた心筋細胞等の賦活化を図って心筋細胞等を修復再生させ、心筋障害に陥った心機能の回復正常化が出来ることになる。それ故、重症の心筋症患者だけでなく、進行中の軽度の患者に

も使用することができる。

また、狭心症等の心筋障害の患者に使用することが出来る。

【0011】

本発明の上記遺伝子製剤であるH V Jリポソーム製剤は、上記H V Jリポソーム法で投与されるために調整された遺伝子製剤であり、非経口的に投与することが好ましい。より好ましいものとして、例えば、非侵襲的なカテーテルあるいは非侵襲的な注射器等による投与方法を挙げることができる。更には、エコー使用下視覚的に非侵襲的なカテーテルあるいは注射器等による投与を挙げることができる。非侵襲的なカテーテルを用いる投与方法としては、例えば、心室内腔より心筋内に直接H G F遺伝子を注入することが挙げられる。

【0012】

このようなH V Jリポソーム製剤としては、公知の方法（、Molecular Medicine,30,1440-1448(1993)、実験医学,12,1822-1826(1994)、蛋白質・核酸・酵素,42,1806-1813(1997)等）に基づくものであれば使用可能であり、好ましくは、Circulation,92(Suppl.II) ,479-482(1995)に記載の方法に準じて作製された遺伝子製剤を用いることができる。

【0013】

本発明のH G F遺伝子を適用することにより、心筋症等を持った心臓疾患患者に対して積極的な遺伝子導入による治療を行うことができ、心筋症に陥った心筋細胞等の賦活化と修復再生が可能となり、心機能の向上が図れることとなった。このように、本発明は重症の心筋症患者にも適用が可能であり、心臓移植以外には治療の手段がない患者の救済も可能となった。

本発明の治療剤の投与量としては、患者の症状等によって異なるが、H G F遺伝子として成人患者当たり約1～約4000 μ gの範囲、好ましくは約10～約400 μ gの範囲から投与量が選択される。

【0014】

本発明の治療剤は、数日ないし数週間に一回投与するのが好適であり、好ましくは各週1回の投与が挙げられる。

投与回数は適宜患者の症状に応じて選択される。治療目的に応じて複数回が好

適であり、好ましくは8回投与することが挙げられる

【0015】

【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

【0016】

実験材料及び方法

実験動物

心筋症ハムスター：Bio 14. 6

HVJリポソーム製剤の投与方法

エコーカルジオグラム（MD500，YOKOKAWA-GE）の操作下、心筋症ハムスター（12週齢）の心臓の腹部側心筋にリポソーム製剤を注入する。

検討内容

1. エコー使用下に心筋症ハムスターの心臓にHVJリポソームを用いてレポーターgeneであるルシフェラーゼを打ち込み、1週間後にその活性を調べた。コントロール群はPBSのみをエコー使用下に注入した。ルシフェラーゼ活性をルミノメーター（Lumat LB9507（BERTHOLO社））で測定し、HGF遺伝子とコントロールの場合を比較する。
2. 心筋内の毛細血管密度をALP染色で測定し、HGF遺伝子とコントロールの場合を比較する。
3. リポソーム製剤が投与された心臓の血流量をレイザー・ドップラー・イメージャー（LDI）スコアで測定し、HGF遺伝子とコントロールの場合を比較する。
4. 心筋のMasson染色を行い、コンピュータ解析により線維化の分布密度を測定し、HGF遺伝子とコントロールの場合を比較する。

【0017】

参照例1

HVJリポソーム製剤の作成

10mgの乾燥脂質（ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、ホレス

テロールの1:4.8:2の混合物)と、HGF遺伝子(100 μ g)-HMG1 (high mobility group 1 nuclear protein, 25 μ g)を含有する等張液(137.0mM NaCl, 5.4mM KCl, 10.0mM Tris-HCl; pH7.6)200 μ lを混合し、激しく攪拌して超音波を掛けてリポソームを形成する。精製センダイウイルス(Z株)を3分間UV照射(110erg/mm²/sec)して使用する。リポソーム懸濁液とセンダイウイルス(HVJ)を混合して4℃10分間、続いて37℃30分間加温する。遊離のHVJを除去して、HVJリポソーム製剤を取得する。

参考例2

ハムスター(1群6匹)にルシフェラーゼ遺伝子10 μ gのリポソーム製剤を投与し、1週間後にルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図1に示す。

図1に示されるとおり、心臓におけるルシフェラーゼは高値を示し、エコー使用下に遺伝子導入が可能であることが証明された。

【0018】

実施例1

心筋症ハムスターへのHGF遺伝子治療

12週齢の心筋症ハムスター(1群6匹)の心臓の腹部側心筋にリポソーム製剤を注入した。コントロール群としては、コントロールベクターの入ったリポソーム製剤を同様に12週齢の心筋症ハムスター(1群6匹)に注入した群を設け、未処理群として無処置の心筋症ハムスター(1群6匹)を設けた。その後、各週にリポソーム製剤を計8回注入した。8週後、20週齢の心筋症ハムスターの心臓の心筋内の毛細血管密度をALP染色で測定し、血流量をLDIスコアを測定した。また、ハムスターを安楽死させた後、心臓を摘出しMasson染色後に、コンピュータによる解析にて線維化の分布密度を測定した。

ALP染色により、HGF遺伝子治療群では顕著に血管新生による毛細管密度の上昇が見られた。この結果を図2に示す

LDIスコアは、コントロール群を100%とすると、HGF遺伝子治療群では163 \pm 7%であり、顕著に血流量が増大していた。この結果を図3に示す。

Masson染色の解析では、HGF遺伝子治療群で顕著な線維化分布密度の減少が

見られた。この結果を図 4 に示す。

【 0 0 1 9 】

【発明の効果】

本発明の H G F 遺伝子心筋障害治療剤は、患部心筋の血管新生を促し、患部の血流量を増大させると共に、心筋の線維化を抑制、軽減し、心機能を回復させることができる。しかも、本発明の治療剤は顕著な B c 1 - x L の減少抑制を示すことから、患部の障害心筋のアポトーシスを防ぎ、保護することができる。また、本発明治療剤は、エコー使用下視覚的に患部心筋層へ、非侵襲的にかつ的確に注入することができる。従ってこれらの効果により、本発明の治療剤は心筋障害をよりの確に治療することができるものである。

【図面の簡単な説明】

【図 1】心筋症ハムスターの心臓に H V J を用いてレポーター gene であるルシフェラーゼを打ち込み、ルシフェラーゼ活性値が高値を示したことで、エコー使用下に遺伝子導入が可能であることが証明されたことを示すグラフである。

【図 2】心臓における毛細血管密度を A L P 着色で測定し、H G F 遺伝子とコントロールの比較を示すグラフである。

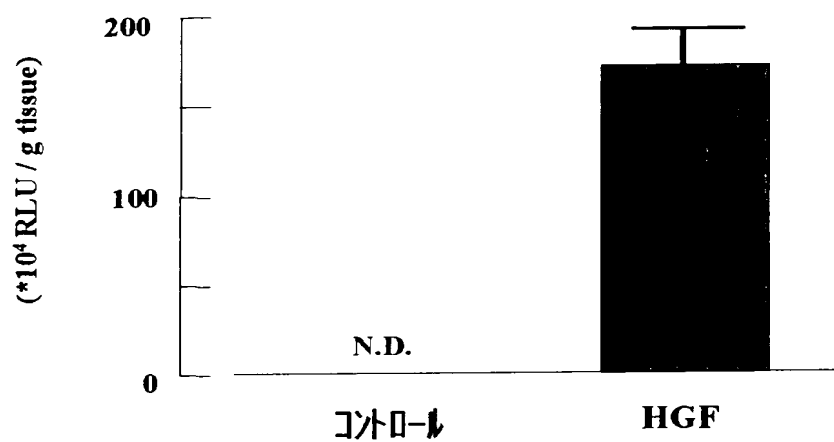
【図 3】心臓の血流量をレーザー・ドップラー・イメージャー (L D I) スコアで測定し、H G F 遺伝子群とコントロール群、非処理群との比較を示すグラフである。

【図 4】心筋における線維化の分布密度を Masson 染色で測定し、H G F 遺伝子とコントロールの比較を示すグラフである。

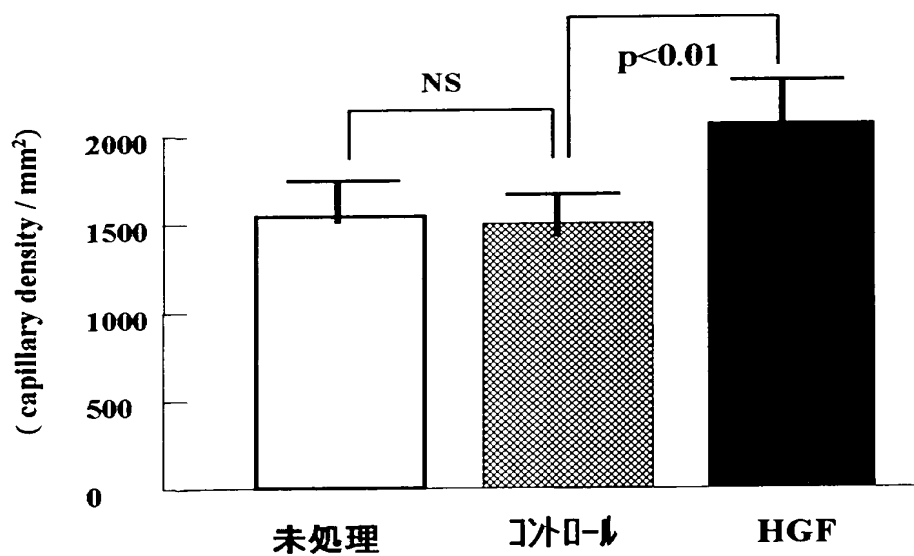
【書類名】

図面

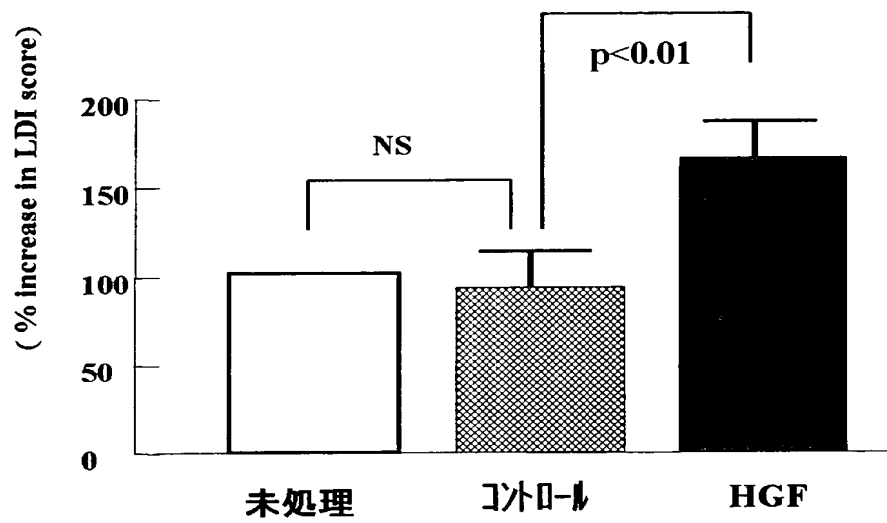
【図 1】



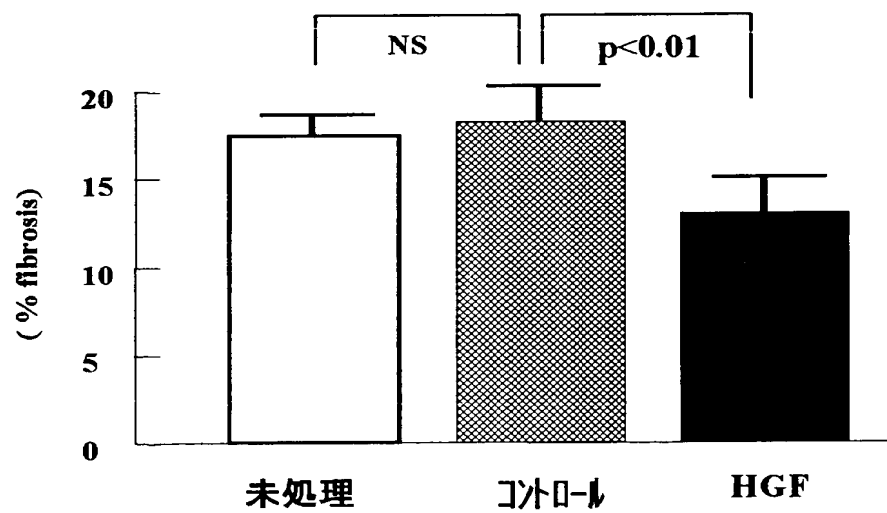
【図 2】



【图 3】



【图 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 エコー使用下、非侵襲的に心筋障害を治療するための H G F 遺伝子治療 H V J リボソーム製剤。

【効果】 損傷を受けた心筋内に有効遺伝子を投与することにより、損傷を受けた心筋層の細胞死を抑制すると共に、心筋層の血管新生の促進と線維化抑制を図り、心機能を回復させるという効果を有する。

【選択図】 なし。

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第288532号
受付番号	59900991266
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成11年10月13日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年10月 8日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [595068287]

1. 変更年月日 1995年 5月12日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市淀川区宮原2-11-22-502

氏 名 森下 竜一

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 1 8 3 3 7 0]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 9 日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市中央区道修町 2 丁目 2 番 8 号
氏 名	住友製薬株式会社